

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 29 907.2

Anmeldetag: 04. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Hans-Konrad
Müller-Hermelink und
Professor Dr. Heinz Vollmers, Würzburg/DE

Bezeichnung: Humaner monoklonaler Antikörper

IPC: C 07 K, A 61 K

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 14. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY



HUMANER MONOKLONALER ANTIKÖRPER

5 Die Erfindung betrifft einen humanen monoklonalen Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen, oder ein funktionelles Fragment davon. Desweiteren sieht die Erfindung Verfahren zur Herstellung des Antikörpers vor, die Verwendung des Antikörpers zur Bekämpfung von Tumoren, und ein Arzneimittel und ein Diagnostikum, welche den Antikörper enthalten.

10 *w* Die derzeitigen Verfahren zur Behandlung von Krebs umfassen eine operative Entfernung des Tumors, Strahlenbehandlungen und Chemotherapie. Ein wesentlicher Nachteil jeder dieser Methoden ist darin zu sehen, daß sie nicht spezifisch auf die Tumorzellen ausgerichtet sind. So kann es bei einer operativen Entfernung beispielsweise vorkommen, daß nicht der ganze Tumor erfaßt wird, was dazu führt, daß sich ein neuer Tumor entwickelt und gegebenenfalls Metastasen gebildet werden, die sich an weiteren Stellen im Körper festsetzen. Bei der Behandlung von Tumoren mit Strahlen oder chemotherapeutischen Mitteln führt die fehlende Selektivität häufig dazu, daß auch gesunde Zellen durch die eingesetzten Mittel geschädigt werden. Die nachteilige Folge hiervon ist, daß die Dosen an Strahlung oder chemischen Wirkstoffen nicht so hoch gewählt werden können, daß sie alle Krebszellen abtöten. Ein wesentlicher Teil der heutigen Krebsforschung zielt daher darauf ab, effektivere und insbesondere selektiv wirkende Verfahren und Mittel zur Bekämpfung von Tumoren zu finden.

25
30 Wie immunologische Studien gezeigt haben, ist auch dann, wenn das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar. Diese Aktivität reicht jedoch nicht aus, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung von Tumoren ist daher, von der Immunantwort des Pa-

tienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen.

5

Ein Verfahren nach dem Stand der Technik, das diesen Weg beschreibt, ist unter dem Namen Hybridoma-Technik bekannt. Es beruht auf der In-Vitro-Gewinnung von zellulären Hybriden, die durch Zellfusion von normalen Lymphocyten mit unbegrenzt lebens- u. teilungsfähigen Myelomzellen gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-Zellen weisen die Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dementsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphocyten, Antikörper zu produzieren, und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen.

10

15

Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Antikörper her, dessen Spezifität von der ursprünglichen Lymphocyten-Zelle bestimmt wird. Die Hybridom-Zellen werden vermehrt und dann diejenigen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hochspezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten antigenen Determinante reagieren. Monoklonale Antikörper, welche spezifisch an Antigene von Tumoren binden, eröffnen daher vielversprechende Möglichkeiten für Diagnose und Therapie von Tumorzellen.

20

25

Zur Verbesserung der Verfahren und Mittel im Kampf gegen Krebs besteht daher der Bedarf an derartigen monoklonalen Antikörpern. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen humanen monoklonalen Antikörper, Verfahren zu dessen Herstellung und aus dem Antikörper abgeleitete Diagnostika und Arzneimittel anzugeben, die eine hohe Spezifität für Antigene verschiedener Tumore aufweisen und sich daher für eine tumorspezifische Therapie und Diagnose gut eignen.

30

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe hinsichtlich des monoklonalen Antikörpers dadurch gelöst, daß

- wenigstens eine variable Region der leichten Ketten substantiell jeweils die in Anlage 2 und/oder der schweren Ketten substantiell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist.

5

10

15

20

25

30

35

Aus chemischer Sicht sind Antikörper Immunglobulin-Moleküle. Diese Moleküle weisen jeweils zwei identische leichte und zwei identische schwere Ketten auf, die durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Jede der Ketten enthält eine Region von etwa 110 Aminosäuren mit variabler Sequenz, während der verbleibende Rest jeder Kette einen Bereich mit konstanter Sequenz aufweist. Die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette ihrerseits umfassen jeweils mehrere hypervariable Regionen, welche für die Bindung der Antigene verantwortlich sind. Die spezielle Ausbildung der hypervariablen Regionen bestimmen daher die spezifischen Eigenschaften des Antikörpers.

Wie klinische Tests belegen, begründet die Ausbildung der genannten variablen Bereiche des erfindungsgemäßen Antikörpers gemäß der angegebenen Aminosäuren-Sequenz eine hohe spezifische Wirksamkeit gegenüber den Antigenen der untersuchten Tumorzellen. Da die auf Tumorzellen auftretenden Antigene auf Normalzellen nicht vorhanden sind, zeigen vorliegende Antikörper gegenüber normalen Zellen erwartungsgemäß keine oder nur geringe Bindung.

Erfindungswesentlich ist die substantielle Gleichheit einer der variablen Regionen der leichten oder der schweren Ketten mit der erfindungsgemäßen Sequenz. Die substantielle Gleichheit bedeutet dabei eine überwiegende Übereinstimmung der genannten Bereiche. Geringfügige Modifikationen oder Substitutionen der Ketten sind in vorliegender Erfindung mit eingeschlossen, sofern der monoklonale Antikörper oder der funktionelle Teil davon tumorspezifische Eigenschaften beibehält.

Tumorspezifische monoklonaler Antikörper nach dem Stand der Technik betreffen in der überwiegenden Zahl der Fälle von Mäusen hergeleitete Antikörper. Jene Antikörper weisen in nachteiliger Weise jedoch eine

stark eingeschränkte Einsatzmöglichkeit auf, da Mausantikörper bei Anwendung auf den Menschen durch dessen Immunsystem als Fremdprotein erkannt und neutralisiert werden können noch bevor sie ihre therapeutische Wirkung entfalten.

5

10

15

Die Erfindung geht demgegenüber von humanen monoklonalen Antikörpern aus, welche diese Beschränkungen bei Einsatz in der Humanmedizin nicht aufweisen. Diese Antikörper weisen Sequenzen der hypervariablen Kettenbereiche auf, die substantiell denen von menschlichem Immunglobulin entsprechen. Die Antikörper können daher nach Erkennung der Determinanten oder Epitope der ihnen entsprechenden Antigene ungehindert an den betreffenden Zellen anbinden, ohne daß eine Abwehrreaktion des Immunsystems erfolgt. Bei einer Kopplung der erfindungsgemäßen Antikörper mit diagnostischen und therapeutischen Mitteln sind vorliegende Antikörper somit in vorteilhafter Weise zur Früherkennung und effektiven Behandlung von Tumoren unterschiedlicher Art geeignet.

20

25

Bei der Lösung der Aufgabe hinsichtlich des Herstellungsverfahrens wird vorgeschlagen, die humanen monoklonalen Antikörper vorzugsweise mittels der Hybridoma-Technik zu erzeugen. Gemäß einem Merkmal der Erfindung werden hierzu B-Lymphozyten aus einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder des Lymphknotens, eines Karzinom-Patienten entnommen. Diese Lymphozyten sind infolge des vorhandenen Karzinoms zur Bildung derjenigen Antikörper stimuliert, welche speziell auf die Antigene der vorliegenden Tumorzellen reagieren.

30

35

Die Lymphozyten werden in vitro jeweils mit einer Myelom-Zelle fusioniert. Gemäß vorliegender Erfindung werden hierbei die Heteromyelomzellen HAB-1 sowie deren Subklone verwendet. Die Heteromyelomzelle HAB-1 ist spezifiziert in der Literatur: Faller, G et al., HAB-1, BrJCancer 62, 595-8 (1990). Gleichmaßen können Subklone der HAB-1-Zelle Verwendung finden, die als HAB-1.X bezeichnenbar sind. Die entstandenen Zellklone besitzen wie die originären B-Lymphozyten die Eigenschaft, Antikörper zu produzieren. Die Spezifität dieser Antikörper wird

dabei durch die ursprüngliche Lymphozyten-Zelle bestimmt. In vorliegendem Fall bedeutet dies, daß auch die von den Zellklonen produzierten Antikörper mit den Antigenen des speziell vorliegenden Tumors korrespondieren. Nach Selektion derjenigen Zellen, die jeweils Antikörper, der gewünschten Spezifität synthetisieren, werden diese Zellen kultiviert und dabei von jeder der Hybridzellen jeweils monoklonale Antikörper in unbegrenzter Menge produziert.

Gemäß einem Merkmal der Erfindung werden bei dem vorgeschlagenen Verfahren insbesondere Lymphozyten von Patienten entnommen, die ein Karzinom des

- Magen
- Dickdarm.
- Bauchspeicheldrüse
- Speiseröhre
- Lunge
- Prostata
- Brust

aufweisen.

Neben einer Herstellung der vorliegenden humanen monoklonalen Antikörper durch die Hybridoma-Technik schließt die Erfindung auch andere Herstellungsmethoden ein. Vorgeschlagen wird, insbesondere bei der Herstellung kleinerer funktioneller Fragmente, die direkte Synthese mittels der dem Fachmann bekannten Rekombinanten-Methode oder der Herstellung mittels der bekannten Phagenbankmethode (phage display).

Die Vermehrung erfolgt unter Anwendung der bekannten Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase chain reaction = PCR).

Das PCR-Verfahren ist dem Fachmann bekannt, beispielsweise aus dem US-Patent 4,683,195. Es dient der gezielten Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments und wird mit Vorteil dann angewandt, wenn DNA-Abschnitte nur in geringen Spuren vorliegen. Das Verfahren ermöglicht, eine bekannte DNA-Sequenz unter einer Vielzahl ähnlicher

Sequenzen zu erkennen und in vitro in kurzer Zeit stark zu vermehren. Hierbei kann eine spezielle DNA-Sequenz innerhalb einer Zeitspanne von ca. 3 h etwa 100.000fach vervielfältigt werden.

5 Bei Anwendung des vorliegenden Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgermäßigen monoklonalen Antikörper, oder von funktionellen Fragmenten davon, wird RNA der Hybridomzellen, die tumorspezifische monoklonale Antikörper produzieren, in vitro mittels reverser Transkriptase in komplementäre doppelsträngige cDNA umkopiert. Anschließend
10 wird die cDNA, welche funktionelle Fragmente der variablen Bereiche der leichten und schweren Ketten enthält, mittels PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden gereinigt, extrahiert und anschließend kloniert.

Der Aufbau des konstanten Bereichs der schweren Kette eines Antikörpers bestimmt dessen Isotyp und legt die Effektor-Funktion des Antikörpers fest. Bei Immunglobulin besteht die konstante Region der schweren Ketten aus einer der fünf in der Literatur mit μ , γ , δ , α oder ϵ bezeichneten Sequenzen, die konstante Region der leichten Ketten aus einer der Sequenzen κ oder λ . Der unterschiedliche Aufbau der schweren Ketten
20 führt zu den fünf Immunglobulin-Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die Antikörper gemäß vorliegender Erfindung gehören in der Regel der Klasse IgM an, wobei sowohl leichte Ketten der Klasse λ als auch κ auftreten können. Ebenso ist eine Ausbildung des Antikörpers gemäß Klasse IgG vorgesehen.

25 Die Erfindung umfaßt monoklonale Antikörper als auch funktionelle Fragmente davon. Dabei ist die Funktionalität der genannten Fragmente dadurch gekennzeichnet, daß sie Eigenschaften des Antikörpers aufweisen. Diese können beispielsweise darin bestehen, daß sie eine Bindungsfähigkeit gegenüber Antigenen oder eine Spezifität für Tumorzellen besitzen, oder aufgrund des Aufbaus ihres konstanten Bereichs eine Effektor-Funktion aufweisen. Gemäß einem Merkmal der Erfindung sind insbesondere Fragmente einbezogen, welche gemäß bekannter Nomenklatur (z.B. Cell Biophysics, 22 (1993), S. 189 – 224) einer der
30 Gruppen
35

$V_L, V_H, F_v, F_c, F_{ab}, F_{ab'}, F(ab')_2$

angehören. Dabei umfaßt die Gruppe

5

V_L Fragmente, welche den variablen oder den variablen und konstanten Bereich der leichten Ketten einschließen

V_H Fragmente, welche den variablen Bereich oder den variablen und den konstanten Bereich der schweren Ketten einschließen

10

F_v Fragmente, welche die variablen Regionen der schweren und der leichten Ketten oder Teile davon einschließen

F_c Fragmente, welche die konstanten Regionen der schweren Ketten oder Teile davon einschließen

F_{ab} Fragmente, welche größer als die Fragmente der Gruppe F_v sind

15

$F_{ab'}$ Fragmente, welche größer als die Fragmente der Gruppe F_{ab} sind

$F(ab')_2$ Fragmente, welche die variablen Bereiche beider schwerer und beider leichter Ketten oder Teile davon enthalten und optional die ersten konstanten Bereiche beider schweren Ketten oder Teile davon.

20

Durch Verwendung der genannten Fragmente ist es möglich, spezielle Anforderungen für bestimmte Anwendungen zu realisieren. Eine Anpassung der Eigenschaften des Antikörpers oder dessen funktioneller Fragmente läßt sich gemäß einem Merkmal der Erfindung auch dadurch erreichen, daß einzelne Aminosäure-Gruppen substituiert und/oder hinzugefügt und/oder entfernt sind. Eingriffe dieser Art führen dazu, daß beispielsweise die Stabilität oder die Selektivität des Antikörpers bzw. dessen funktioneller Fragmente modifiziert werden, dessen globalen Eigenschaften, wie beispielsweise die Bindungsfähigkeit gegenüber Tumor-Antigenen, jedoch erhalten bleiben.

30

Die Antikörper bzw. deren funktionelle Fragmente gemäß vorliegender Erfindung können mit weiteren Wirkstoffen verbunden werden. Durch eine Ankopplung derartiger Substanzen werden die Anwendungsbereiche des vorliegenden Antikörpers wesentlich erweitert. Insbesondere

35

lassen sich die humanen monoklonalen Antikörper gemäß vorliegender Erfindung hierdurch für diagnostische Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen und für therapeutische Verfahren zur Bekämpfung von Tumorzellen einsetzen.

Gemäß einem Merkmal der Erfindung sind insbesondere folgende Substanzen vorgesehen:

- eine radiaktive Substanz,
- und/oder ein Farbstoff,
- und/oder ein Enzym,
- und/oder ein Immunotoxin,
- und/oder ein Wachstumshemmer,

wobei diese Wirkstoffe

- zum qualitativen oder quantitativen Nachweis,
- zur Verringerung der Proliferation,
- zur Erzeugung der Apoptose
- zur Vermeidung von Metastasenbildung

von Tumorzellen dienen können.

Der Nachweis von Tumorzellen wird häufig mit dem Fachleuten unter dem Namen Immunoassay bekannten Verfahren geführt, dessen Grundlage die Antigen-Antikörper-Reaktion ist. Um aus dieser Reaktion quantitative Aussage gewinnen zu können, wird der Antikörper gemäß vorliegender Erfindung mit einer gut nachweisbaren Markierungssubstanz gekoppelt. Substanz und Kopplung sind dabei so gewählt, daß die immunologischen Eigenschaften der Komponenten weitgehend erhalten bleiben. Die bekanntesten Immunoassays sind Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay und Fluoreszenzimmunoassay. Im Ergebnis ermöglichen die an die Antikörper angekoppelten diagnostischen Substanzen empfindliche und zuverlässige Verfahren zur Früherkennung von Krebs.

Die genannten cytotoxischen Substanzen zielen auf eine Verminderung der Lebens- oder Teilungsfähigkeit der Tumorzellen. Sie bewirken alternativ eine Unterdrückung der DNA-Synthese, Unterdrückung der Zellteilung, Apoptose der Zellen oder einen nicht apoptotischen Zelltod. Sie bringen damit das Wachstum von Tumorzellen zum Stillstand oder bringen Tumorzellen zum Absterben.

Durch Kopplung der genannten Substanzen mit den selektiv gegen Krebszellen wirksamen Antikörpern gemäß vorliegender Erfindung lassen sich somit gezielt Tumore unterschiedlicher Art wirkungsvoll bekämpfen. Die Erfindung sieht hierbei insbesondere

- die Diagnose
- und/oder Prophylaxe
- und/oder Therapie

folgender Tumore vor:

- Adeno-Karzinom des Colons
- Adeno-Karzinom des Endometriums.

Schließlich umfaßt vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel und ein Diagnostikum, die jeweils dadurch gekennzeichnet sind, daß deren Wirkstoffe den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthalten. Die genannten Mittel enthalten in der Regel weitere Zusatzstoffe, wie physiologische Lösungen, Lösungsmittel, Glycole, Öle oder dergl. im Stand der Technik bekannte Substanzen.

METHODEN, BEISPIELE UND EINZELHEITEN

5

Antikörper CM-2

Schwere Kette (VH)

10

Aminosäure-Sequenz

siehe Anlage 1.

DNA-Sequenz

siehe Anlage 1

15

Leichte Kette (VL)

Aminosäure-Sequenz

20

siehe Anlage 2

DNA-Sequenz

siehe Anlage, 2

Methode 1:

Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit einer Variante des Heteromyeloms HAB-1 nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefaßt, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline.

Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Der nächste Test ist eine immunhistochemische Färbung auf Cryoschnitten des autologen Tumors.

Benötigte Medien:

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
- RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin

Immortalisierung:

- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz oder Lymphknoten) auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 - 1:3 HAB-1 zu Lymphozyten, fusionieren
- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/min zentrifugieren

- das zuvor bei 37 °C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37 °C rotieren lassen
- danach wir das PEG mit RPMI ohne Zusätze heraus gewaschen (zwei volle 10er Pipetten)
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24-Well-Platten ausplattieren mit 1 ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24-Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

Methode 2:

Molekulare Charakterisierung der Antikörper

Zur Sequenzierung der monoklonalen Antikörper wird cDNA aus gesamt RNA (RNAse Kit, Quiagen) von Triomen hergestellt (M-MLV reverse transcriptase, Gibco). Anschließend werden die entsprechenden VH-Gene durch PCR-Amplifikation vervielfältigt (Taq Polymerase, MBI-Fermentas). Die PCR-Produkte werden über Gel-Elektrophorese gereinigt und extrahiert. Nach dem Klonieren der PCR-Produkte (pCR-Script Amp SK+cloning kit, Stratagene) werden die positiven Klone sequenziert (DyeDeoxy Termination cycle sequencing kit, Applied BioSystems). Die Sequenzen werden mit Hilfe von Dnasis für Windows, Genbank und V-Base Databases analysiert (Vollmers et al., 1998).

Immunhistochemische Charakterisierung

Antikörper, die mit dem autologen Tumor reagieren, werden auf einem Panel von Normalgeweben und Tumorgeweben im Immunperoxidase Test (Protokoll siehe unten) untersucht, um einen Überblick über die Reaktion des Antikörpers und die Verteilung des Antigens zu erhalten.

Antikörper, die spezifisch mit den Tumorzellen reagieren und nicht mit gesundem Gewebe, werden weiter untersucht. Zunächst auf Tumoren des gleichen Typs verschiedener Patienten, dann auf Tumoren anderer Organe und schließlich auf Normalgeweben. Eine nähere Charakterisierung des Antikörpers und des Antigens erfolgt nur, wenn das Reaktionsmuster des Antikörpers auf eine zumindest eingeschränkte Spezifität mit malignem Gewebe schließen lässt.

Immunperoxidasefärbung auf Kryoschnitten und Cytospins

- Objektträger (OT)
- OT's nach dem Schneiden mindestens 2 h trocknen lassen
- OT's 10 min in Aceton stellen
- 30 min trocknen lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen und anschließend 5 min in Tris-NaCl stehen lassen
- mit 100 µl Milchpulver (3 % in PBS) absättigen für 15 - 30 min
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- 100 µl des jeweiligen 1. Antikörpers:
 - für negative Kontrolle RPMI
 - für positive Kontrolle CK8 1:50 mit BSA/PBS oder CAM 5.2 1:10 mit BSA/PBS (BSA 0,5 %ig in PBS)
- 30 min inkubieren lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- 100 µl des jeweiligen 2. Antikörpers:
 - Rabbit Anti Maus Peroxidase konjugiert
- 70 % PBS + 30%Humanserum + 1:50 AK

→ Rabbit Anti Human IgM Peroxidase konjugiert

70 % PBS + 30 % Kaninchenserum + 1:50 AK

- 30 min inkubieren lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- OT's 10 min in PBS stellen
- 1 DAB-Tablette und 1 H₂O₂-Tablette in 1 ml Leitungswasser lösen
- 100 µl Substrat auf die OT's pipettieren und für 10 min inkubieren lassen
- mit Aqua dest. spülen
- OT's für 5 min in Hämalaun stellen
- 15 min fließend wässern
- OT's in Aqua dest. stellen und mit Glyceringelatine eindecken

Färbungen auf Tumor-Geweben

Tumorgewebe wurden gefärbt, um beurteilen zu können, auf wie vielen Karzinomen die zu untersuchenden Antikörper eine Reaktion zeigen.

Färbungen auf Tumorgeweben

Tumortyp	CM-2
Colon, Adeno-Ca	+
Schilddrüsenkarzinom	-
Bronchial-Ca, plattenep.	-
Bronchial-Ca, kleinzellig	-
Bronchial-Ca, großzellig	-
Bronchial-Ca, Karzinoid	-
Magen, Adeno-Ca	-
Ösophagus, Plattenep.-Ca	-
Pankreas, Adenokarzinom	-
Hepatozell. Karzinom	-
Cholangiozell. Karzinom	-

Nierenzellkarzinom	-
Nephroblastom	-
Blase, Urothelkarzinom	-
Mammakarzinom, duktal	-
Mammakarzinom, lobulär	-
Endometrium, Adeno-Ca	+
Prostata, Adenokarzinom	-
Seminom	-
Dottersacktumor	-
Teratom	-
Teratokarzinom	-
Melanom	-
Thymom	-
Fibrosarkom	-
Myxofibrosarkom	-
Rhabdomyosarkom	-
Leiomyosarkom	-
Neuroblastom	-
Plattenep.-Ca Oropharynx	-
akute myel. Leukämie	-

Färbungen auf Normalgewebe

Organ	CM-2	Organ	CM-2
Schilddrüse	-	Corpus pineale	-
Lunge	-	Hypophyse	-
Aorta	-	Knochenmark	-
Myokard	-	Blut	-
Herzbeutel	-	Kleinhirn	-
Zunge	-		
Ösophagus	-		
Magen	-		
Dünndarm	-		
Kolon	-		

Rektum	-
Pankreas	-
Thymus	-
Tonsilla palatina	-
Lymphknoten	-
Nebenniere	-
Niere	-
Blase	-
Ductus deferens	-
Prostata	-
Hoden	-
Mamma	-
Ovar	-
Tuba uterina	-
Corpus uteri	-
Cervix uteri, Portio vag.	-
Haut	-
Skelettmuskel	-
Plazenta	-
Rückenmark	-
Großhirnrinde	-

Färbungen auf fetalen Geweben

Organ	CM-2
Lunge	-
Magen	-
Ileum	-
Pankreas	-
Leber	-
Milz	-
Thymus	-
Niere	-
Rückenmark	-

Großhirnrinde	-
Kleinhirn	-
Corpus pineale	-
Hypophyse	-

Cell-Death-ELISA^{PLUS} (Firma Roche, Mannheim)

Das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch den Antikörper CM-1 wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{plus} analysiert. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem Peroxidase-konjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die gegen Histon- bzw. DNA-Komponenten gerichtet sind. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates kann dann anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch bestimmt werden.

Hierzu werden 100 µl einer Zellsuspension ($1.0 \times 10^5/\text{ml}$) der verschiedenen Zell-Linien mit 100 µl der unverdünnten bzw. 1:1 verdünnten Antikörperüberstände in einer 96-Well-Platte für 24h im Brutschrank bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen 10 min lang bei 200 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 µl Lysispuffer hinzugegeben, wodurch in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen erfolgt. Nach erneutem Zentrifugieren werden jeweils 20 µl des Überstandes in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten übertragen und dann 80 µl des Immunoreagentes (1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-Histon Biotin, 18/20 Inkubationspuffer) hinzupipettiert. Zusätzlich wird eine im Testkit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Nachdem die Platten 2 Stunden lang bei ca. 250 rpm durchmischt worden sind, wird nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer (250 µl) 100 µl der ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5ml Substratpuffer) in jedes Well pipettiert. Nach erneutem Durchmischen spiegelt sich dann die Intensität der antikörperinduzierten

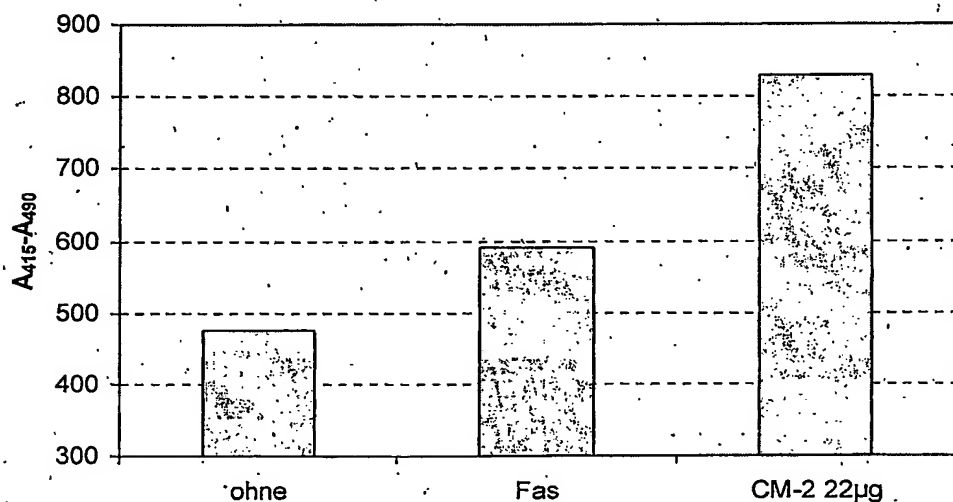
Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider. Die Farbintensität wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei $\lambda = 415 \text{ nm}$ gegen die Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen und daraus die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose errechnet.

CellDeathELISA

Antikörper: CM-2

Zell-Linie: CACO-2

Inkubationszeit: 24h



ohne: Negativkontrolle (RPMI 1460-Medium)

CD95 Fas: $2 \mu\text{g/ml}$ positive Kontrolle (= käuflich erwerbbarer AK)

CM-2: $22 \mu\text{g/ml}$ Antikörperüberstand

Nach 24 stündiger Inkubation zeigte der untersuchte Antikörper CM-2 im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte Apoptose-Indikation, wobei der Effekt bei CM-2 den der Negativkontrolle um das 1,46 überstieg.

MTT-Test

- Zellen trypsinisieren und in 10 ml RPMI-Vollmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendieren
- Zellen zählen und auf 1×10^6 Zellen pro ml verdünnen
- in eine 96-Well-Platte 50 μ l Zellsuspension pro Well pipettieren, (erste Reihe freilassen!), d.h. pro Well liegt eine Zellzahl von 5×10^4 Zellen vor
- pro Well 50 μ l Antikörper (verschiedene Verdünnungen in Vollmedium) hinzufügen
- 96-Well-Platte 24 h bzw. 48 h im Brutschrank inkubieren
- 50 μ l MTT-Lösung in jedes Well pipettieren
- Platte 20 min im Brutschrank inkubieren
- Platte anschließend 10 min bei 2800 rpm zentrifugieren und den Überstand absaugen
- 150 μ l DMSO pro Well hinzufügen und das Zellpellet resuspendieren
- Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm und 690 nm im ELISA-Reader bestimmen.

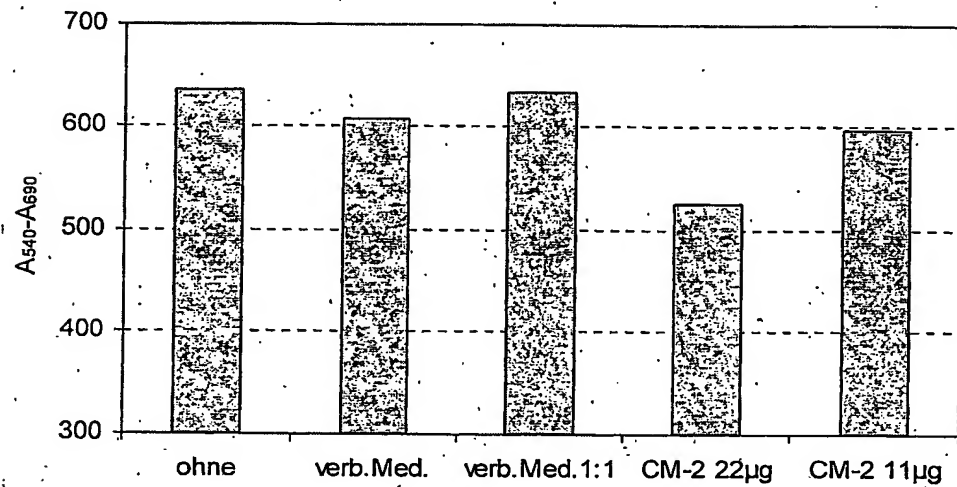
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium (SIGMA), 5mg/ml in PBS lösen.

MTT-Test

Antikörper: CM-2

Zell-Linie: COLO-206F (Kolon-Karzinom)

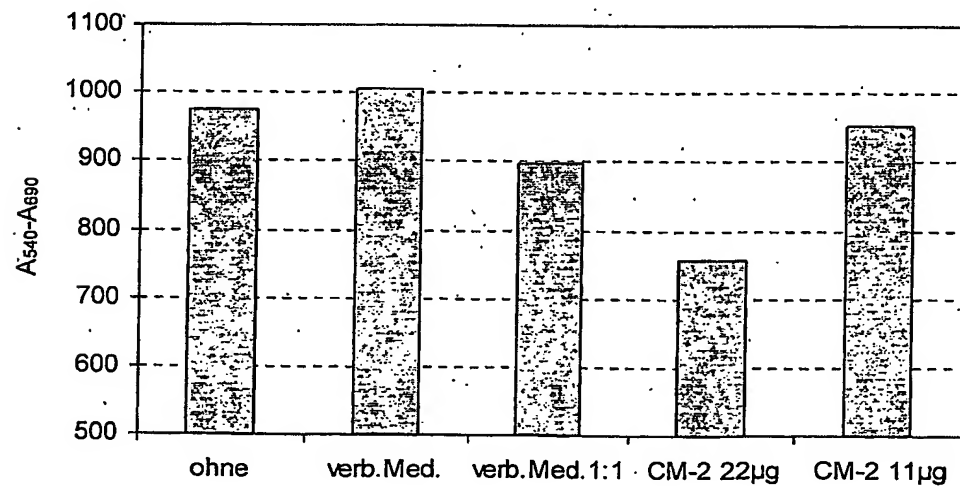
Inkubationszeit: 24h



Antikörper: CM-2

Zell-Linie: COLO-206F (Kolon-Karzinom)

Inkubationszeit: 48h



<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
Prof. Dr. Vollmers, H. Peter

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<141> 2002-05-13

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) des Antikörpers CM-2
(Klon 98/81-33-154)

<221> V-Region

<222> (1)...(327)

<400>

aaa aag ccc ggg gag tct ctg agg atc tcc tgt aag ggc tct gga tac agt ttt acc acc Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr 1 5 10 15 20	60
tac tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg ggg atc atc Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile 25 30 35 40	120
tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc caa ggc cag gtc acc atc tca Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser 45 50 55 60	180
cc gac acg tcc atc agt acc gcc tac ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr 65 70 75 80	240
gcc ata tat tac tgt gcg agg gag gtc tat act ggc cga aac tac tac tac tac ggt ctg Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Tyr Thr Gly Arg Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu 85 90 95 100	300
gac gtc tgg ggc caa gga acc ctg gtc Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 105	327

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
Prof. Dr. Vollmers, H. Peter

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<141> 2002-05-13

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) des Antikörpers CM-2
(Klon 98/81-33-154)

<221> V_L-Region

<222> (1)...(330)

<400>

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct gga cag tcg atc acc atc	60
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile	
1 5 10 15 20	
tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag	120
Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln	
25 30 35 40	
cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gat gtc agt aat cgg ccc tca ggg gtt	180
His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val	
45 50 55 60	
tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct gga ctc	240
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu	
65 70 75 80	
cag gct gag gac gag gct gat tac tac tgc agc tca aaa aga agc agc aac act cta gta	300
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Lys Arg Ser Ser Asn Thr Leu Val	
85 90 95 100	
ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	330
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
105 110	

PATENTANSPRÜCHE

- 5 1. Humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen, oder funktionelles Fragment davon, **dadurch gekennzeichnet, daß**
- 10 - wenigstens eine variable Region der leichten Ketten substanziell jeweils die in Anlage 2 und/oder der schweren Ketten substanziell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist.
- 15 2. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1 mittels der Hybridoma-Technik, **dadurch gekennzeichnet, daß**
- 20 - die Hybridom-Zellen durch Fusion
- der Heteromyelomzellen HAB-1 sowie deren Subklone
- mit B-Lymphozyten gewonnen werden,
- welche aus einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder Lymphknoten, eines Karzinom-Patienten entnommen sind.
- 25 3. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß**
- 30 - die B-Lymphozyten einem Patienten mit
- einem Karzinom des Magen, Dickdarm, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Brust, Prostata oder Speiseröhre entnommen sind.
- 35

4. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß**

- er/es mittels der Rekombinanten-Methode hergestellt wird.

5

5. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß**

- er/es mittels der Gentechnologie hergestellt wird,
- unter Anwendung von Phagenbanken (phage display-Methode).

10

6. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 5, **dadurch gekennzeichnet, daß**

- der Aufbau der konstanten Region der schweren Ketten dem von Immunglobulin M oder G (IgM oder IgG) entspricht.

15

20

7. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 6, **dadurch gekennzeichnet, daß**

- das genannte funktionelle Fragment einer der Gruppen

- V_L
- V_H
- F_v
- F_c
- F_{ab}
- F_{ab}'
- $F(ab')_2$

angehört.

30

35

8. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- einzelne Aminosäure-Gruppen
- substituiert,
- und/oder hinzugefügt,
- und/oder entfernt sind.

9. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- eine erste Substanz angekoppelt ist, insbesondere
- eine radioaktive Substanz,
- und/oder ein Farbstoff,
- und/oder ein Enzym,
- und/oder ein Immunotoxin,
- und/oder ein Wachstumshemmer.

10. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- eine zweite Substanz angekoppelt ist, insbesondere
- zum qualitativen oder quantitativen Nachweis,
- zur Verringerung der Proliferation,
- zur Erzeugung der Apoptose
- zur Vermeidung von Metastasenbildung von Tumorzellen.

11. Verwendung des monoklonalen Antikörpers oder eines funktionellen Fragmentes davon nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Bekämpfung von Tumoren, **dadurch gekennzeichnet**, daß es/er

- zur Diagnose
 - und/oder zur Prophylaxe
 - und/oder zur Therapie
- insbesondere folgender Tumore eingesetzt wird:
- Adeno-Karzinom des Colons oder des Endometriums

5

12. Arzneimittel, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- dessen Wirkstoff den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthält.

10

13. Diagnostikum, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- dessen Wirkstoff den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthält.

15

ZUSAMMENFASSUNG

HUMANER MONOKLONALER ANTIKÖRPER

5

10

15

Beschrieben wird ein humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich besitzen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß wenigstens eine variable Region der leichten und/oder der schweren Ketten substanziell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist. Desweiteren sieht die Erfindung Verfahren zur Herstellung des Antikörpers vor, die Verwendung des Antikörpers zur Bekämpfung von Tumoren, und ein Arzneimittel und Diagnostikum, welche den Antikörper enthalten.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.